

Title	Phosphorylation of Rabphilin-3A by Calmodulin-dependent Protein Kinase II
Author(s)	加藤, 正樹
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/39903
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	かとうまさき 藤正樹
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第12361号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Phosphorylation of Rabphilin-3 A by Calmodulin-dependent Protein Kinase II (カルモジュリン依存性プロテインキナーゼIIによる Rabphilin-3 Aのリン酸化)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 谷口 直之 教授 平野 俊夫

論文内容の要旨

[目的]

低分子量GTP結合蛋白質 Rab 3 Aは神経伝達物質放出の制御に関与していることが明らかになっている。私共は、Rab 3 AはGTP結合型の活性型に転換されると、シナプス小胞に局在する標的蛋白質 Rabphilin-3 Aに結合し、その結果、シナプス小胞は前シナプス膜に運ばれてドッキングすると考えている。その後、 Ca^{2+} の流入によってシナプス小胞と前シナプス膜とが融合して神経伝達物質が放出されるが、Rabphilin-3 AはC2様領域と呼ばれる Ca^{2+} とリン脂質の結合部位を有していることから、神経伝達物質放出における Ca^{2+} センサーとして働いている可能性がある。一方、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII (CaMK II)はシナプシンIをはじめシナプスの種々の蛋白質のリン酸化を介して神経伝達物質放出の制御に関与することが明らかになっている。

そこで、本研究では、Rabphilin-3 AがCaMK IIによってリン酸化されるか否か、また、リン酸化がRabphilin-3 Aの生理活性に影響するか否かを検討した。

[方法ならびに結果]

1) 材料の調整

Rab 3 AおよびRabphilin-3 Aは、各々の蛋白質をバキュロウイルス発現系により大量発現させた Sf 9 昆虫細胞の細胞膜画分より精製した標品を使用した。CaMK IIは、ラット大脳より精製した標品を使用した。Rab 3 A GTPase-activating protein (GAP)はラット大脳より部分精製した標品を使用した。

2) CaMK II による Rabphilin-3 Aのリン酸化

25pmolのRabphilin-3 Aに5 pmolのCaMK IIを加え、40mM HEPES/NaOH (pH8.0), 5 mM Mg (C₂H₃COO)₂, 0.1mM EGTA, 0.01% Tween-20, [γ -³²P] ATP (2.5x10³cpm)のバッファー条件で、0.2mM CaCl₂および4 μ Mカルモジュリンの存在下、非存在下で30℃、10分間反応させた。標品を電気泳動してRabphilin-3 Aの放射活性を測定したところ、Rabphilin-3 Aは Ca^{2+} およびカルモジュリン依存性にCaMK IIによってリン酸化された。

CaMK IIによるRabphilin-3 Aのリン酸化は時間依存性であり、1 molのRabphilin-3 Aに対して最高2 molのリン酸が取り込まれた。Rabphilin-3 AのKm値は5 μ Mであり、このKm値はシナプシンIと同様の値であることからRabphilin-3 AはCaMK IIのよい基質であると考えられた。

3) CaMKIIによるRabphilin-3Aのリン酸化部位の決定

CaMKIIによってリン酸化されたRabphilin-3AをAPIプロテアーゼを用いて完全消化した後、C8カラムクロマトグラフィーを行なった。各フラクションの放射活性を測定し、そのピークフラクションのアミノ酸配列を分析してリン酸化部位を決定したところ、リン酸化部位はS³⁴、T²⁰⁵、T²⁰⁹、およびT⁵³⁷であることが明らかになった。

4) CaMKIIによるリン酸化がRabphilin-3Aに与える影響

リン酸化および非リン酸化Rabphilin-3Aと [³⁵S] GTPγS結合型のRab3Aを反応させ、Rabphilin-3Aと結合したRab3Aを測定した。Rab3Aとの結合には、Rabphilin-3Aのリン酸化は影響しなかった。次に、リン酸化および非リン酸化Rabphilin-3Aを、リン脂質よりなるリポソームと様々なCa²⁺濃度で反応させ、リポソームと結合したRabphilin-3Aを測定した。Ca²⁺依存性のリン脂質との結合にはRabphilin-3Aのリン酸化は影響しなかった。Rabphilin-3AはRab3Aに対して弱いGAP活性とRab3A GAP存在下で強いGAP抑制活性(GIP活性)を有している。リン酸化および非リン酸化Rabphilin-3Aを用いてGAP活性とGIP活性を測定したが、リン酸化はこれらの活性に影響しなかった。

[総括]

本研究では、Rabphilin-3AがCaMKIIによって1 molに対して2 molリン酸化されることを明らかにした。Rabphilin-3AのKm値は5 μMでシナプシンIとほぼ同じであり、Rabphilin-3AはCaMKIIによって生理的にリン酸化される可能性が高いと考えられた。実際に、私共は、分泌刺激によってCaMKIIが活性化することが明らかになっているPC12細胞を用いた実験系において、Rabphilin-3Aが分泌刺激に依存してリン酸化されることを確認している。また、Rabphilin-3AのCaMKIIによるリン酸化部位はS³⁴、T²⁰⁵、T²⁰⁹、およびT⁵³⁷であったが、このうちS³⁴とT⁵³⁷はウシ、ラット、及びマウスにおいてよく保存されており生理的意義をもつ部位と考えられた。今回の解析では、Rabphilin-3AのGTPγS結合型Rab3Aとの結合や、Ca²⁺依存性のリン脂質との結合、およびRab3Aに対するGAP活性やGIP活性にはリン酸化は影響しなかったが、CaMKIIによるRabphilin-3Aのリン酸化によって神経伝達物質の放出が制御されている可能性は十分に考えられ、今後、これらの知見をふまえて更に研究を続けていく必要がある。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により低分子量GTP結合蛋白質Rab3Aの標的蛋白質Rabphilin-3Aが、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII (CaMKII) によってリン酸化されるか否か、およびRabphilin-3Aの生理活性に影響を与えるか否かを解析した。その結果、Rabphilin-3AはCa²⁺およびカルモジュリンに依存してCaMKIIによってリン酸化される良い基質であることが明らかになった。Rabphilin-3AのCaMKIIによるリン酸化部位はS³⁴、T²⁰⁵、T²⁰⁹、およびT⁵³⁷であり、このうちS³⁴とT⁵³⁷はウシ、ラット、およびマウスにおいて保存されており生理的意義のある部位であることが示唆された。今回の解析では、Rabphilin-3AのRab3Aとの結合や、Ca²⁺依存性のリン脂質との結合、およびRab3Aに対するGTPase促進活性(GAP活性)やGAP抑制活性(GIP活性)にはリン酸化は影響を与えなかったが、CaMKIIによるRabphilin-3Aのリン酸化が神経伝達物質放出の制御に関与している可能性を十分に示唆するものであった。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究といえる。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。